

PRÜFUNG VON PAPIER, KARTON UND PAPPE

Bestimmung der Gesamtkeimzahl (GKZ) in Papier, Karton und Vollpappe

Merkblatt
VIII/4/63

Ausgegeben
am 21. Oktober 1938



VEREIN DER ZELLSTOFF- UND PAPIER-CHEMIKER UND -INGENIEURE

Fachausschuß für Pappenerzeugung

PRÜFUNG VON PAPIER, KARTON UND PAPPE

Bestimmung der Gesamtkeimzahl (GKZ) in Papier, Karton und Vollpappe

Dieses Merkblatt wurde von der Untergruppe »Oberflächenkeimzahlbestimmung« (Obmann: Erich P. Petermann, Herzberg [Harz]) der Arbeitsgruppe »Lebensmittelkonservierung« beim Institut für Lebensmitteltechnologie und Verpackung e. V., München, in Zusammenarbeit mit dem Fachausschuß »Pappenerzeugung« ausgearbeitet.

1. Zweck und Anwendung

Das Merkblatt beschreibt ein Prüfverfahren zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl in Papier, Karton und Vollpappe. Packstoffe müssen für bestimmte Verwendungszwecke möglichst frei von Mikroorganismen sein. Schädlich können sich nicht nur Mikroorganismen auswirken, die sich auf der Oberfläche (siehe Merkblatt VIII/3/68) dieser Packstoffe befinden, sondern auch solche, die im Verpackungsmaterial enthalten sind. Weiterhin ist dieses Verfahren zur Kontrolle der Wirksamkeit von bakteriziden und fungiziden Zusatzstoffen in der Papierfabrikation geeignet.

2. Begriff

Die Gesamtkeimzahl (GKZ) gibt die Anzahl der Keime an, die nach einer Bebrütungszeit von 3 Tagen bei einer Temperatur von 25° C in 1 g der zu untersuchenden, ofentrockenen Probe gefunden werden.

3. Probenahme, Probenanzahl

3.1 Die Probeentnahme erfolgt nach DIN 53 101. Es dürfen nur die Ränder der Proben angefaßt werden. Die entnommenen Proben sind sofort aufeinander in

ein sterilisiertes Probenahmegefäß zu legen. Falls ein solches Gefäß nicht vorhanden ist, werden die Proben in Echtpergament eingeschlagen.

3.2 Die Probenanzahl soll pro Entnahmeeinheit mindestens 10 Stück betragen.

4. Prüfgeräte

4.1 *Brutschrank*, regelbar auf eine Temperatur von 25° C \pm 1 grad. (Diese Temperatur muß an allen Stellen im Brutraum gleichmäßig sein).

4.2 *Autoklav* für einen Betriebsdruck bis 3,5 at und eine Sterilisationstemperatur bis 134° C. Er muß so eingerichtet sein, daß eine Mindesttemperatur von 120° C \pm 2 grad eingehalten werden kann.

4.3 *Dampftopf*.

4.4 *Haßblutsterilisator* für eine Sterilisationstemperatur von 160 bis 170° C.

4.5 *Kolonienzählgerät*. Es ist zur Arbeitserleichterung zweckmäßig, nach Möglichkeit ein Kolonienzählgerät zu verwenden, das mit einer elektrischen Zählrichtung und einer Lupe von 8- bis 10facher Vergrößerung versehen ist. Die Platten sollen von unten beleuchtet werden können.

4.6 *Petrischalen* aus Glas nach DIN 12 339 bzw. Einweg-Petrischalen aus Kunststoff, Durchmesser 87 bis 97 mm.

4.7 *Schere*. Gipsschere oder ähnlich starke Schere aus nichtrostendem Stahl. Die Schere darf beim Sterilisieren ihre Schneidkraft nicht verlieren.

4.8 *Korkbohrer und Korkbohrerschärfer.* Der Korkbohrer soll einen Durchmesser von 15 mm haben.

4.9 *Pinzetten oder Kornklammern.*

4.10 *Meßpipetten mit weitem Ausfluß,* die gestatten, 1,0 ml genau zu messen.

4.11 *Pipettenbüchse.*

4.12 *Aufschlaggerät.* (Empfohlen wird Ultra-Turax TP 18/2 N nach Professor Willems mit auswechselbarem Schaft und Schlitzlager aus Polytetrafluoräthylen).

4.13 *200-ml-Babyflaschen* aus Glas mit 100-ml-Markierungen.

4.14 *Rollrandflaschen* mit Bügelverschluß, 250 ml.

4.15 *Nährbodenflaschen,* 300 ml mit Kapsenbergkappen.

4.16 *Wägegäschchen,* Durchmesser 3 cm, Höhe 3 cm, DIN 12 605. Es ist empfehlenswert, diese Gläschen mit laufender Nummer versehen zu beziehen.

4.17 *Waage* mit einer Genauigkeit von $\pm 0,0001$ g.

4.18 *Membranfiltergerät.*

4.19 *Bunsenbrenner oder Spirituslampe.*

5. Nährmedien und Nährmedienherstellung

5.1 *Standard-II-Nährboden.* Um immer gleichmäßige Nährmedien zu erhalten, ist Standard-II-Nähragar Merck, Art.-Nr. 7883, zu verwenden.

Falls alternativ der Nährboden angefertigt werden soll, ist wie folgt zu verfahren:

Zusammensetzung	Merck-Katalog Nr.:
3,45 g Pepton aus Fleisch	7214
3,45 g Pepton aus Casein	7213
5,1 g Natriumchlorid	6404
13,0 g Agar-Agar	1614
25,0 g	

5.1.2 *Bereitung:*

Die angegebenen Mengen Nährstoffe werden einem Liter frisch destilliertem oder voll entsalztem Wasser zugesetzt und unter ausgiebigem Umschütteln gleichmäßig verteilt, bis zur Lösung im Dampftopf gekocht und in vier 300-ml-Nährbodenflaschen umgefüllt. Die Sterilisation erfolgt im Autoklaven 15 min bei 120° C mit aufgesetzten Kapsenbergkappen, damit die Lösung nicht durch auftropfendes Kondenswasser verdünnt wird. Der pH-Wert des gebrauchsfertigen Nährbodens soll bei 20° C $7,3 \pm 0,2$ betragen.

5.2 *Ringerlösung*

Zusammensetzung	Merck-Katalog Nr.:
2,250 g Natriumchlorid p. a.	6404
0,105 g Kaliumchlorid p. a.	4936
0,120 g Calciumchlorid p. a.	2332
0,050 g Natriumhydrogencarbonat p. a.	6329
2,525 g	

5.2.2 *Bereitung:*

Die angegebenen Chemikalienmengen werden in 1000 ml frisch destilliertem oder voll entsalztem Wasser gelöst und in 250-ml-Rollrandflaschen mit Bügelverschluß gegeben. Die Sterilisation erfolgt mit offenem Bügelverschluß im Autoklaven 15 min bei 120° C. Es kann auch nach der Membran-Filter-Methode sterilisiert werden.

6. Durchführung der Prüfung

6.1 *Sterilisation der Geräte.* Korkbohrer, Wägegäser, Babyflaschen, Pinzetten, Scheren, Glaspetrischalen, Pipetten und der Schaft des Aufschlaggerätes sind im Heißluftsterilisator 2 Stunden lang, bei mindestens 160° C, zu sterilisieren. Bei Serienanalysen können Pinzetten, Scheren und Korkbohrer und der Schaft des Aufschlaggerätes auch durch Abflammen sterilisiert werden.

6.2 *Probenvorbereitung.* Aus den Proben werden mit einer sterilen Schere Versuchsstücke in der Größe von etwa 15 x 15 mm ausgeschnitten oder zweckmäßigerweise mit einem sterilen Korkbohrer ausgestanzt. Die Versuchsstücke dürfen nur mit sterilen Pinzetten oder Kornklammern, nicht aber mit den Fingern berührt werden. Je Probe sind mindestens 10 Versuchsstücke von je etwa 1,5 g auszuschneiden oder auszustanzen. Es ist 1 g des zu untersuchenden Materials unter sterilen Bedingungen in ein steriles Wägegäser einzuwägen. Die Einwaage wird in eine sterile Babyflasche gegeben, die mit 99 ml Ringerlösung gefüllt ist. Mit einem sterilen Aufschlaggerät werden die Versuchsstücke zerkleinert. Nach einer Aufschlagzeit von 1 min wird meist eine ausreichende, sehr feine Verteilung erhalten, die sich verhältnismäßig langsam absetzt. Bei der Entnahme ist dafür zu sorgen, daß evtl. abgesetzte Fasern neu aufgewirbelt werden. Dies erfolgt am besten mit der zur Entnahme bestimmten sterilen Pipette. Die erhaltene Faserstoffsuspension stellt die Basissuspension für die weitere Prüfung dar.

6.3 *Gesamtkeimzahlbestimmung.* Jeweils 1 ml der Basissuspension wird in eine Petrischale gegeben und mit 10 ml Agar einer Temperatur von nicht mehr als 43° C ± 2 grad versetzt. Damit sich der Nähragar gleichmäßig mit der Basissuspension vermischt, wird die Petrischale mit geschlossenem Deckel vorsichtig in Achtertouren, nicht kreisförmig, bewegt. Die Schalen werden waagrecht abgestellt, bis das Gemisch erstarrt ist. Bei warmem Wetter sollten die Petrischalen in einem Kühlschrank oder auf eine von Leitungswasser durchflossene Kühlplatte gesetzt werden. Es ist unbedingt erforderlich, für jede Entnahmeeinheit nur Nährboden des gleichen Ansatzes einzusetzen. Für jede Prüfung sind 10 Basissuspensionen herzustellen. Bei sorgfältigem Arbeiten genügt es, den Rührer für die 10 Proben einer Entnahmeeinheit nur einmal im Heißluftsterilisator zu sterilisieren.

6.4 *Bebrütung*. Die nach 6.3 vorbereiteten Petrischalen werden 3 Tage bei 25° C bebrütet. Die Platten sind so in den Brutschrank zu legen, daß der Deckel der Petrischale nach unten zu liegen kommt, um das Auftropfen von Kondenswasser auf die Probe zu verhindern.

6.5 *Trockengehaltsbestimmung*. Die Trockengehaltsbestimmung des zu untersuchenden Materials erfolgt an Hand einer Parallelprobe nach DIN 53 103. Bei der Probenahme ist zu beachten, daß ausreichendes Versuchsmaterial für die Trockengehaltsbestimmung mit entnommen wird.

7. Versuchsauswertung

Die Petrischalen werden nach Ablauf der Brutzeit dem Brutschrank entnommen. Mit dem Keimzählgerät wird die Anzahl der Kolonien gezählt. Bei der Abzählung ist zu beachten, daß nicht Fasern mitgezählt werden. Dazu ist eine mikroskopische Kontrolle bei 80facher Vergrößerung durchzuführen, wobei Fasern leicht zu erkennen sind: Das Ergebnis der Auszählung von zehn Platten wird addiert und das arithmetische Mittel gebildet. Unter Berücksichtigung des Trockengehalts wird der Mittelwert auf 1 g ofentrockenes Untersuchungsmaterial umgerechnet.

8. Prüfbericht

Im Prüfbericht sind unter Hinweis auf dieses Merkblatt anzuführen:

- Art der untersuchten Probe;
- Ort, Datum und Zeit der Probenahme;
- pH-Wert der Proben nach DIN 53 124 (Kaltextraktion);
- Trockengehalt der Probe nach DIN 53 103;
- Gesamtkeimzahl der eingewogenen Probe;
- Gesamtkeimzahl, umgerechnet auf ofentrockene Probe.

Gegebenenfalls Abweichungen von der Vorschrift dieses Merkblattes.

9. Anmerkungen

Dieses Merkblatt wurde von der Untergruppe »Oberflächenkeimzahl« ausgearbeitet und das Prüfverfahren durch mehrere Ringversuche in verschiedenen Labora-

torien geprüft. Zur praktischen Anwendung werden noch folgende Hinweise gegeben:

9.1 Es werden nicht alle vorhandenen Keime erfaßt, sondern vorzugsweise nur die, die bei der gewählten Bebrütungstemperatur aerob wachsen. Auch bei sorgfältigstem Aufschlagen ist keine Gewähr dafür gegeben, daß nur einzelne Mikroorganismen und keine Zusammenballungen gefunden werden. Auch ist der vorgeschlagene Nährboden für alle Keime nicht gleich gut geeignet. Die Gesamtkeimzahlbestimmung ist also eine lediglich für die Praxis geschaffene Prüfung. Sie liefert bei gleichbleibenden Untersuchungsbedingungen durchaus wiederholbare Ergebnisse.

9.2 Um verlässliche Ergebnisse zu erhalten, sollten Ungeübte diese Methode genau durcharbeiten.

9.3 Zur Vermeidung von Fremdinfectionen ist in einem vor Luftzug geschützten Raum zu arbeiten und der Arbeitstisch etwa eine halbe Stunde vor Arbeitsbeginn mit einer desinfizierenden Lösung abzuwaschen (z. B. 70%iger Alkohol).

9.4 Da nur 30 bis 300 Keime auf einer Platte mit Sicherheit ausgezählt werden können, sind bei hohen Keimzahlen die Basissuspensionen zu verdünnen bzw. bei sehr niedrigen Keimzahlen die Einwaage zu erhöhen.

9.5 Bei naßfesten Packstoffen reicht unter Umständen die Aufschlagzeit von 1 min nicht aus. Bei längerer Aufschlagzeit sollte das Aufschlaggefäß gekühlt werden, damit die Temperatur im Gefäß nicht über 45° C steigt.

9.6 Da die meisten Papier- und Pappenfabriken kein mikrobiologisches Laboratorium unterhalten, bietet die Firma Sartorius Membranfilter GmbH, Göttingen, Postfach 142, gebrauchsfertige sterile Nährböden an, die diesem Merkblatt entsprechen. Als Ausrüstung für solche Laboratorien genügt ein Brutschrank, siehe 4.1.

10. Literatur

T 449 os-57 - Bacteriological examination of paper and paperboard.

G. Windaus, E. Petermann, Ein neuer Einheitsnährboden für die Oberflächenkeimzahlbestimmung und Vorschlag zur Gesamtkeimzahlbestimmung in Vollpappen, Das Papier 20, 865-874 (1966).